

RECH. REP. O. M. 1978 / 21.

Dosage de la nitrate réductase en Mer du Nord et dans la

partie aval de l'estuaire de l'Escaut.

Martine Somville
Laboratoire d'Océanographie
U. L. B.

L'azote minéral semble être un élément limitant pour la production primaire en Mer du Nord. D'autre part, l'Escaut apporte en mer d'importantes quantités de nitrate et d'ammoniaque dans des proportions déterminées par les phénomènes microbiologiques qui se produisent dans son estuaire.

Il est généralement admis que le phytoplancton peut employer le nitrate et l'ammoniaque comme source d'azote, mais préfère l'ammoniaque si toutes deux sont disponibles. La présence dans le phytoplancton de nitrate réductase (NR), enzyme d'assimilation du nitrate a souvent été interprétée comme évidence de l'emploi du nitrate (Eppley et al 1969, Bates 1976, Conway 1977). L'absence de l'enzyme permet de dire qu'une source d'azote, autre que le nitrate, est employée par le plancton (ammonium, amines, urée).

Bien que l'activité enzymatique estimée in vitro est plus faible que l'assimilation de nitrate estimée par d'autres méthodes : disparition du nitrate (Eppley et al 1969), assimilation de $^{15}\text{NO}_3^-$ (Collos et al 1978), le dosage de la nitrate réductase dans le phytoplancton semble une bonne mesure qualitative de l'emploi du nitrate.

Simultanément à des mesures de nutriments, des dosages de nitrate réductase ont été effectués au large de Calais, dans les eaux côtières belges et dans la partie aval de l'estuaire de l'Escaut (derniers 35 km) au cours d'un cycle annuel.

Le principe de la mesure de NR est d'obtenir un extrait cellulaire de phytoplancton, d'y ajouter du nitrate et un coenzyme sous forme réduite : NADH à des concentrations non limitantes, et de suivre au cours du temps l'apparition de nitrite dans l'extrait.

Pour rapporter les dosages enzymatiques au phytoplancton, ils sont exprimés par unité de chlorophylle a.

Extraction et dosage de la nitrate réductase.

L'extraction et le dosage de la NR employés sont décrits par Eppley et al (1969).

Le phytoplancton est recueilli sur des filtres en fibres de verre GF/C retenant les particules de taille supérieure à 1 μ . Par prélèvement, 3 filtres sont récoltés, 1 de ces filtres immédiatement surgelé est destiné au dosage de la chlorophylle a.

Les deux autres filtres sont placés dans un potter à piston en téflon, ainsi que 4 ml de tampon phosphate 0.2 M , pH 7.9 contenant 1mm/l de cystéine, agent réducteur. Le tout est maintenu dans un bain de glace. Les filtres sont alors broyés pendant le temps minimum nécessaire à l'homogénéisation. 2.5 ml d'une solution de KNO_3 (10 mM) et MgSO_4 (100 mM) et 0.5 ml d'une solution de NADH (150 μM) sont ajoutés à l'extrait cellulaire. Une aliquote du mélange est immédiatement prélevée et filtrée sur membrane en acétate de cellulose de porosité 0.2 μ . 2 ml de filtrat sont bloqués par 5 ml d'éthanol p. a. et 0.2 ml d'acétate de zinc 1 M pour doser le nitrite dans l'extrait cellulaire avant incubation.

Après incubation le reste du mélange est traité comme ci-dessus. Après centrifugation des extraits bloqués à l'éthanol et à l'acétate de zinc, l'activité de la nitrate réductase est évaluée par la production de nitrite dans l'extrait cellulaire au cours de l'incubation. La méthode colorimétrique de dosage du nitrite (Armstrong et al 1967) a été employée.

La production de nitrite dans l'extrait cellulaire reste constante pendant la première heure (voir fig. 1). Une heure semble donc le temps optimal d'incubation.

Les mesures réalisées de mars 1977 à mai 1978 sont reprises dans le tableau n°1.

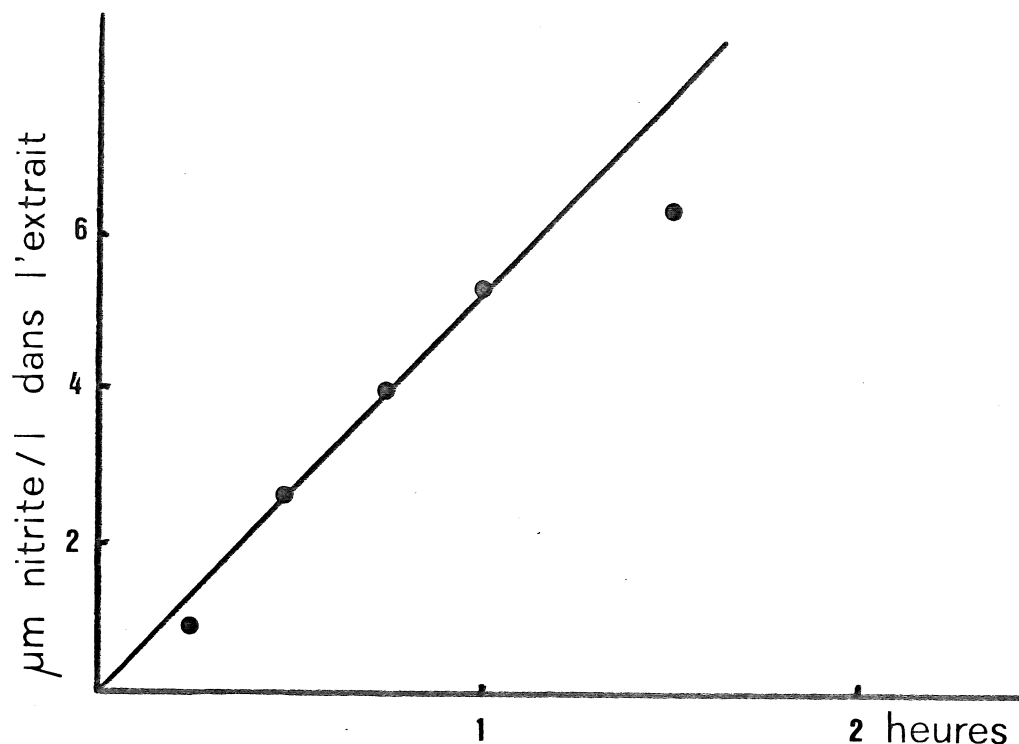


Figure 1 : Evolution au cours du temps de la concentration en nitrite dans un extrait cellulaire de phytoplancton.

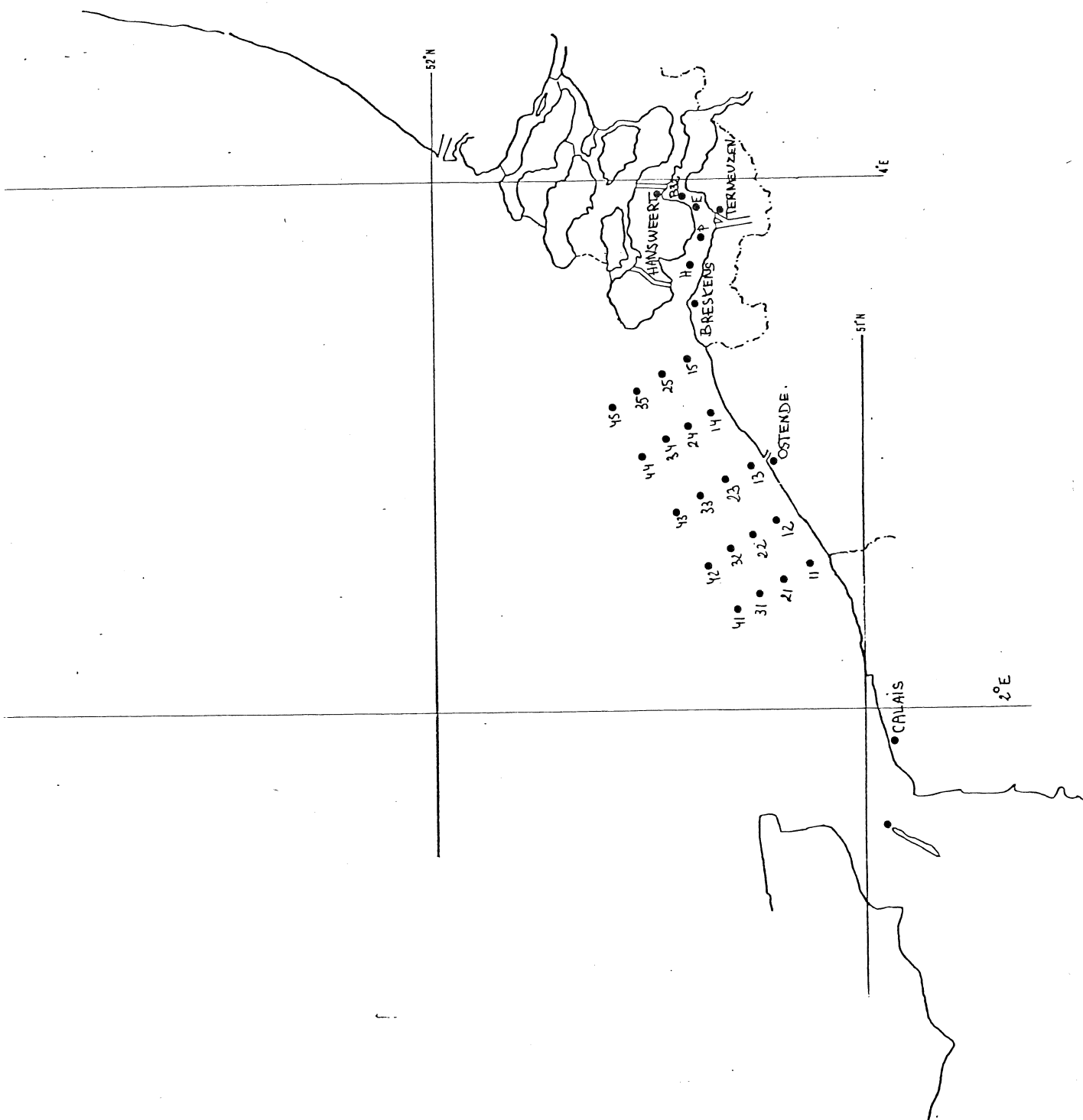
Bibliographie.

- ARMSTRONG, F.A.J., STEMS, C.R. & STRICKLAND, J.D.H. 1967.
The measurement of upwelling and subsequent biological processes by means of the Technicon Autoanalyser
Deep-Sea Res. 14, 381-389.
- BATES, S.S., 1976. Effects of light and ammonium on nitrate uptake by two species of estuarine phytoplankton
Limn. & Ocean. 21 (2) 212-218.
- COLLOS, Y. & SLAWYK, G. 1978. Nitrate reductase activity as a function of in situ nitrate uptake and environmental factors of euphotic zone profiles. J. exp. mar. biol. & ecol. 119-130.
- CONWAY, H.L., 1977. Interactions of inorganic nitrogen in the uptake and assimilation by marine phytoplankton. Mar. Biol. 39, 221-232.
- EPPLEY, R.W., COATSWORTH, J.L. & SOLORZANO, L., 1969. Studies of nitrate reduction in marine phytoplankton. Limn. & Ocean. 14, 184-195.

Tableau 1 : Dosages de nitrate réductase de mars 1977 à mai 1978, exprimés en production de nitrite par litre d'eau et par heure ($\mu\text{m NO}_2^-/\text{l.h}$) et par unité de chlorophylle ($\mu\text{m NO}_2^-/\text{mg chl. a. heure}$). Les valeurs correspondantes de nutriments : NO_2^- , $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, NH_4^+ , et de chlorophylle a (Lorenzen Limn. & Ocean. 12 343 1967) sont également indiquées.

$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ } pour 1977 : publié dans Tech. Rep. Survey 1978/02 (J.P.Mommaerts & I. Elskens)
 NH_4^+ } 1978 : en préparation : G. Decadt & J.P. Mommaerts.

Chl. a* : pour 1977 : publié dans Tech. Rep. Survey 1978/03 (J. Neys & A. Berthels)
 pour 1978 : en préparation : J. Neys & A. Berthels.



date	prélèvement	nutrients / μ mole/l.					chlorophyll a		nitrate réductase	
		NO_2^-	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ *	NH_4^+	NH_4^+ *	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g/l}^*$	$\text{nmol NO}_2^- / 1 \text{ eq. h}$	$\mu\text{M NO}_2^- / \text{mg chl a. h}$
30/03/77	21			16.7		0.36	6.68		0.77	0.12
	31			9.99		0.07	5.79		0.38	0.07
	41			1.1		0.29	13.35		0.38	0.03
31/03/77	15			31.4		1.7	2.0		1.2	0.6
	25			28.2		1.4	5.35		1.6	0.36
	35			19.5		0.6	2.67		0	0
	45			6.4		0.3	11.35		0	0
28/04/77	15			20.4		ND		20	7.2	0.36
	25			17.4		"		37	13.6	0.37
	35			9.5		0.43		16	6.6	0.41
	45			4.3		ND		40	26.8	0.67
05/05/77	Escaut									
	1. Breskens	104			14		12.01		3.9	0.32
	3. Paulinapolder	124			36		9.66		31.4	3.25
	5. Eendrachtspolder	173			19		12.28		19.9	1.62
25/05/77	7. Hansweert	215			61		2.70		29.9	11.10
	35			4.8		3.4			0.58	
	13			8.7		4.4		2.67	1.19	0.45
27/05/77										

ND=non détectable.

date	prélèvement	nutrients / μ mole/l.					chlorophyll a		nitrate réductase	
		NO_2^-	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- *$	NH_4^+	$\text{NH}_4^+ *$	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g/l} *$	$\text{mM NO}_2^- / 1 \text{ eau. h}$	$\mu\text{M NO}_2^- / \text{mg chl a. h}$
26/05/77	11			6.7		8.8			0.45	
	21			2.4		4.2			0.87	
	31			0.7		2.8			0.38	
	41			0.1		0.8			0	
20/09/77	13			19.8		20.2		4.94	1.8	0.36
	23			72.7		42.5		4.11	3.4	0.83
	33			34.7		30.4		2.95	0.5	0.17
	43			1.6		26.7		1.55	0.9	0.58
23/11/77	13			23.7		33.8	4.14		0	0
	14			32.1		20.5		4.0	0	0
12/12/77	13	2.4	13.2	11.3	4.3	5.4	1.5	1.85	0	0
	23	2.3	45.9	22.7	5.5	6.3	2.14		0	0
	33	1.8	12	14.9	3.0	6.7	1.89	1.2	5.3	2.80
	43	1.8	10.9	9.4	2.2	3.7	0.57		4.3	7.54
13/12/77	15	2.4	65.2	74.1	7.2	12.2	3.5	2.9	0	0
	25	1.9	43.1	22.2	2.9	5.3	1.78	6.0	0	0
	35	1.4	35.2	16.2	2.8	5.4	2.23	1.8	0	0
	45	1.9	29.6	16.5	2.8	4.7	0.83	1.6	3.7	4.46

date	prélèvement	nutrients / μ mole/l.					chlorophylle a		nitrate réductase	
		NO_2^-	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- *$	NH_4^+	NH_4^{+*}	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g/l}^*$	$\text{nm NO}_2^- / 1 \text{ eau.h}$	$\mu\text{M NO}_2^- / \text{mg chl.a.h}$
02/04/78	51° 21' N 2° 34' E	0.31	8.76		0.61		6.94		1.9	0.27
	51° 20' N 2° 27' E	0.27	8.5		0.65		7.29		2.7	0.37
	51° 12' N 2° 06' E	0.21	12.4		0.63		0.77		0	0
	CALAIS 12h	0.10	4.8		0.91		1.52		0	0
03/04/78	MECHELEN									
07/04/78	7. HANSWEERT	15.41	261		28.17		1.07		10.4	9.72
	BOUEE 32	13.06	193		46.4		1.01		25.0	24.75
	TERNEUZEN	7.36	181		25.9		5.66		55.0	9.72
	PAULINAPOLDER	4.73	105		13.8		2.67		7.5	2.79
09/04/78	HOOFDPLAAT	1.89	61		6.29		3.58		5.6	1.56
	BRESKENS	1.12	54		3.98		5.21		9.4	1.8
	<i>F. Heinicke</i> 35 / 12 h	0.13	15		1.2		5.28		1.5	0.28
	CALAIS 12 h	1.12	18.2		3.76		0.28		0.4	1.54
12/04/78	35 / 12 h	0.81	19.4		2.81		4.78		1.0	0.20
	51° 26' N 3° 03' E	0.51	20.6		11.83		6.94		4.2	0.60

date	prélèvement	nutrients / μ mole/l.					chlorophyllle a		nitrate réductase	
		NO_2^-	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ *	NH_4^+	NH_4^+ *	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g/l}^*$	$\text{nM NO}_2^- / 1 \text{ eau} \cdot \text{h}$	$\mu\text{M NO}_2^- / \text{mg chl}a \cdot \text{h}$
12/04/78	51° 26' N 2° 59' E	0.45	19.9		20.89		5.34		2.9	0.54
	51° 25' N 2° 55' E	0.61	29.9		21.64		6.25		2.1	0.34
	51° 25' N 2° 50' E	0.56	24.6		19.88		6.91		3.9	0.56
13/04/78	35 / 12 h	0.30	23.5		3.51		3.97		2.6	0.66
	51° 21' N 2° 30' E	0.25	17.8		1.23		18.96		9.13	0.48
	51° 15' N 2° 13' E	0.28	16.5		2.81		9.89		3.3	0.33
16/04/78	51° 09' N 1° 57' E	1.11	15.8		2.63		8.07		3.1	0.38
	50° 59' N 1° 44' E	0.33	13.7		1.08		1.88		0	0
	35 / 12 h	0.19	28.2		1.91		1.81		0	0
	51° 25' N 2° 55' E	8.95	30.2		3.65		3.74		1.7	0.46
	51° 26' N 2° 59' E	9.01	26.6		5.94		4.00		0.5	0.13

date	prélèvement	nutrients / μ mole/l.					chlorophyllle a		nitrate réductase	
		NO_2^-	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$	NH_4^+	NH_4^{+*}	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g/l}^*$	$\text{nM NO}_2^- / 1 \text{ eq. h}$	$\mu\text{M NO}_2^- / \text{mg chl a. h}$
16/04/78	51° 26' N 3° 03' E	9.02	21.3		9.21		3.04		0	0
17/04/78	CALAIS	0.08	8.4		0.4		0.67		0.04	0.06
	MECHELEN									
21/04/78	HANSWEERT 9h30	6.5	209		36.3				37.6	
	11h	7.9	249		35.7		0.5		2.96	5.92
	12h	7.0	241		29.6		0.89		4.21	4.73
	13h15	5.8	204		22.4		1.34		50.8	37.9
	13h50	5.1	191		18.9		3.74		33.6	8.98
	TERNEUZEN 15h15	2.8	113		6.9		3.74		8.9	2.38
	BRESKENS 16h05	1.4	64		3.5		4.01		6.32	1.58